

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 33/569	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/02745 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Januar 1998 (22.01.98)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/01453</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 10. Juli 1997 (10.07.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 28 067.2 11. Juli 1996 (11.07.96) DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: RINDER, Heinz [DE/DE]; Karl-Theodor-Strasse 62, D-80803 München (DE). ZÄHLER, Monika [DE/DE]; Ainmillerstrasse 5, D-80801 München (DE). LÖSCHER, Thomas [DE/DE]; Harmatinger Strasse 7, D-81377 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: CA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.</p>	
<p>(54) Title: DETECTION OF MICROSPORIDIA AND MICROSPORIDIAN INFECTIONS</p> <p>(54) Bezeichnung: NACHWEIS VON MIKROSPORIDIEN UND MIKROSPORIDIENINFEKTIONEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Microsporidia are an unusually difficult group of parasites to detect. The new detection method should enable microsporidia to be detected without previous cultivation of the agent, without DNA-amplification techniques and without microscopic methods. A cDNA library is created from the mRNA of an <i>Encephalitozoon cuniculi</i> culture and immunogenic clones with polyclonal antibodies against <i>E. cuniculi</i> are identified and expressed as recombinant antigens after being cloned in an expression vector. Antigens of other types of microsporidia which cannot be cultivated are produced on a DNA-level by hybridising homologous gene sections and by consecutive isolation and expression. This produces a large number of pure antigens which can be used either directly for the serologic detection of antibodies or for immunisation and thus the production of mono and polyclonal antibodies. With these antibodies microsporidia can in turn be directly detected by detecting their antigens in the clinical samples of humans and animals as well as environmental samples and food stuffs without previous cultivation of the agent, DNA-amplification techniques or microscopic methods being necessary. The invention can be used to detect microsporidia and microsporidian infections, in particular in the clinical samples of humans and animals as well as environmental samples and food stuffs by antigen-antibody reactions.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Mikrosporidien sind eine ungewöhnlich schwer nachzuweisende Gruppe von Parasiten. Die neue Nachweismethode soll den Nachweis von Mikrosporidien ohne vorherige Kultivierung der Erreger, ohne DNA-Amplifizierungstechniken und ohne mikroskopische Methoden ermöglichen. Aus mRNA einer Kultur von <i>Encephalitozoon cuniculi</i> wird eine cDNA-Bank hergestellt und immunogene Klone mit polyklonalen Antikörpern gegen <i>E. cuniculi</i> identifiziert und nach Umklonierung in einen Expressionsvektor als rekombinante Antigene exprimiert. Antigene weiterer, auch nicht kultivierbarer Mikrosporidienarten werden auf DNA-Ebene durch Hybridisierung homologer Genabschnitte und anschließender Isolation und Expression erzeugt. Dadurch werden Antigene in großer Menge und Reinheit verfügbar, die entweder direkt zum serologischen Nachweis von Antikörpern oder zur Immunisierung und damit zur Gewinnung von mono- und polyklonalen Antikörpern eingesetzt werden können. Mit diesen Antikörpern können wiederum Mikrosporidien direkt durch Nachweis ihrer Antigene aus klinischem Material von Menschen und Tieren sowie aus Umweltproben und Nahrungsmitteln nachgewiesen werden, ohne daß dazu eine vorherige Kultivierung der Erreger, DNA-Amplifizierungstechniken oder mikroskopische Methoden notwendig sind. Anwendungsgebiet ist der Nachweis von Mikrosporidien und Mikrosporidieninfektionen, insbesondere aus klinischem Material von Menschen und Tieren sowie aus Umweltproben und Nahrungsmitteln durch Antigen-Antikörper-Reaktionen.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Nachweis von Mikrosporidien und Mikrosporidieninfektionen

Beschreibung

Die Erfindung betrifft den Nachweis von Mikrosporidien, insbesondere aus klinischem Material von Menschen und Tieren sowie aus Umweltproben und Nahrungsmitteln durch Antigen-Antikörper-Reaktionen.

Es ist bekannt, daß Mikrosporidien eine ungewöhnlich schwer nachzuweisende Gruppe von Parasiten darstellen. Obwohl vor dem Auftreten von HIV-Infektionen klinische Manifestationen der Mikrosporidien selten waren, bzw. nicht als solche erkannt worden sind, deuten serologische Untersuchungen aus Schweden darauf hin, daß 12% immunkompetenter Erwachsener und 33% der AIDS-Patienten mit Mikrosporidien infiziert sind oder waren [Garcia & Shimizu (1993) Lab. Med. 24:13-18]. In Europa, Australien und den USA wurden sie bei 15 bis 30% von AIDS-Patienten, die an Durchfall litten, gefunden [Canning et al. in: Curry & Canning (1993) J. Inf. 27:229-236]. Neuere Untersuchungen belegen, daß auch für Deutschland davon ausgegangen werden muß, daß die überwiegende Zahl der Mikrosporidiosen nicht als solche diagnostiziert werden [Franzen et al. (1994) Infection 22:417-419]. Besondere Schwierigkeiten bereitet der Nachweis von Mikrosporidien der Gattung *Enterocytozoon*. *E. bienewisi* ist zusammen mit *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* und *Encephalitozoon hellem* nicht nur am häufigsten für Mikrosporidieninfektionen bei AIDS-Patienten verantwortlich, sondern auch für die klinisch fulminantesten Verläufe [Curry & Canning (1993) J. Inf. 27:229-236; Garcia & Shimizu (1993) Lab. Med. 24:13-18]. *E. bienewisi* befällt vor allem Enterozyten des Dünndarms, aber auch den Dickdarm und führt zu unstillbaren, chronisch-sekretorischen Diarrhöen mit ausgeprägtem körperlichem Verfall. Über die Epidemiologie ist äußerst wenig bekannt, lediglich der Nachweis von *E. bienewisi* bei einem HIV-negativen Patienten mit schwerer Diarrhö [Sandfort et al. in: Curry & Canning (1993) J. Inf. 27:229-236] läßt darauf schließen, daß zumindest diese Art beim Menschen verbreiteter ist als bisher angenommen wurde.

Der Nachweis von Mikrosporidieninfektionen im Rahmen der konventionellen parasitologischen und histologischen Diagnostik ist unverändert problematisch. Einerseits wird der lichtoptische Nachweis durch die geringe Größe der Sporen erschwert (1 bis 1,5 µm bei *E. bienewisi*); andererseits stehen derzeit noch keine spezifischen Färbemethoden für Mikrosporidien zur Verfügung. Die Sporen fallen nicht nur in die Größenordnung von Bakterien, sondern müssen auch von Hefesporen und anderen Pilzen unterschieden werden. Alle bisher verwendeten Färbemethoden (PAS, Versilberung, modifizierte Trichromfärbung, Trichrom-Blau, modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbungen, Chromotrop-Färbungen, Interferenz/Phasenkontrast) sowie die bisher untersuchten immunologischen Methoden haben nur den Stellenwert von Such- oder Screening-Methoden mit sehr begrenzter Sensitivität und Spezifität [Garcia & Shimizu (1993) Lab. Med. 24: 13-18; Weber et al. (1994) Clin. Microbiol. Rev. 7:426-461; Ombrouck et al. (1995) Am. J. Trop. Med. Hyg. 52:89-93]. Als immunologische Methoden wurden IFAT, Western-Blot und ELISA eingesetzt, wobei zur Erzeugung der mono- oder polyklonalen Antikörper stets Antigenpräparationen aus ganzen Sporen von *E. cuniculi* [Weiss et al. (1992) Am. J. Trop. Med. Hyg. 47:456-462], *E. intestinalis* [Ombrouck et al. (1996) C. R. Acad. Sci. Paris 319:39-43; Didier et al. (1995) J. Clin. Microbiol. 33:3138-3145; Beckers et al. (1996) J. Clin. Microbiol. 34:282-285], *E.*

hellem [Visvesvara et al. (1994) J. Clin. Microbiol. 32:2760-2768; Schwartz et al. (1993) J. Ophthal. 115:285-292; Croppo et al. (1991) J. Protozool. 38:31S], *Glugea atherinae* [Ombrouck et al. (1995) Am. J. Trop. Med. Hyg. 52:89-93] oder mehreren, kultivierbaren Mikrosporidienspezies [Didier et al. (1995) Parasitol. 111:411-421; De Groote et al. (1995) J. Infect. Dis. 171:1375-1378; Visvesvara et al. (1995) J. Clin. Microbiol. 33:930-936; Zierdt et al. (1993) J. Clin. Microbiol. 31:3071-3074; Aldras et al. (1994) J. Clin. Microbiol. 32:608-612; Visvesvara et al. (1991) J. Protozool. 38:105S-111S; Sobottka et al. (1995) J. Clin. Microbiol. 33:2948-2952] eingesetzt wurden. Zum Nachweis von Antikörpern gegen Mikrosporidien wurden ebenfalls entweder Sporen oder ihr Gesamtantigen verwendet [Visvesvara et al. (1994) J. Clin. Microbiol. 32:2760-2768; Schottelius et al. (1995) Folia Parasitol. 42:169-172]. Eindeutige Identifikation und Artdifferenzierung waren bislang auf den elektronenmikroskopischen Direktnachweis angewiesen, der jedoch nur bei sehr hoher Parasitendichte erfolgversprechend ist und meist Biopsate und damit invasive Techniken voraussetzt. Der zweifelsfreie Nachweis im Sinne eines Goldstandards war somit nicht nur mit einem erheblichen methodischen Aufwand verbunden, sondern setzte außerdem noch eine ausreichende vorherige Anreicherung voraus, die direkt aus Stuhl oft nicht zu erreichen ist [Corcoran et al. (1995) J. Clin. Pathol. 48:725-727]. Eine hierzu wünschenswerte Kultivierung ist jedoch gerade für die klinisch wohl bedeutendste Art, *E. bienewisi*, bislang noch nicht gelungen. Der Direktnachweis von Mikrosporidien-DNA mittels PCR brachte deshalb einen wichtigen methodischen Fortschritt, ist bisher aber auf Forschungslabors beschränkt und derzeit noch nicht umfangreich validiert [u. a.: Franzen et al. (1996) J. Infect. Dis. 173:1038-1040; Weiss et al. (1994) Folia Parasitol. 41:81-90; Katzwinkel-Wladarsch et al. (1997) Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 16:7-10]. Ein weiterer wichtiger Grund, der die Mikrosporidiendiagnostik bisher verhinderte, ist das Fehlen aussagekräftiger immundiagnostischer Tests. Die bisher untersuchten Antikörper zeigten noch kein ausreichendes diagnostisches Potential für einen sensitiven und spezifischen Nachweis von Mikrosporidien-Antigenen [Didier et al. (1995) J. Clin. Microbiol. 33:3138-3145]. Dies gilt vor allem für *E. bienewisi*, da bislang nur unzureichend gereinigte Antigenpräparationen als Ausgangsmaterial zur Verfügung stehen. Dadurch wird auch die Zuverlässigkeit ihres Einsatzes für seroepidemiologische Untersuchungen beeinträchtigt.

Aufgabe der Erfindung ist es, einen Nachweis von Mikrosporidien ohne vorherige Kultivierung des Erregers, ohne DNA-Amplifizierungstechniken und ohne mikroskopische Methoden zu ermöglichen.

Dieses Problem wird durch die Gegenstände der Ansprüche 1 bis 21 gelöst.

Die mit der Erfindung erzielten Vorteile bestehen darin, daß damit auch nicht-spezialisierten Routinelabors der Nachweis von Mikrosporidien ermöglicht wird und damit dem Großteil der betroffenen Patienten zugute kommt. Der Nachweis wird dadurch vereinfacht, daß die zu untersuchenden Materialien zunächst mit einem sensitiven Suchtest untersucht, und nur die dort positiven Fälle mit artspezifischen Bestätigungstests genauer charakterisiert werden können. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß artspezifische Antigene und durch sie auch artspezifische Antikörper auch ohne Kultivierung der jeweiligen Mikrosporidienart erzeugt werden können.

Ausführungsbeispiele der Erfindung werden im folgenden näher beschrieben:

Eine in Kultur vermehrungsfähige Mikrosporidienart ist *E. cuniculi*. Aus einer solchen Kultur

werden die Mikrosporidien während der logarithmischen Phase und damit zu einer Zeit hoher Syntheseleistung, verbunden mit hoher Genexpression und damit einem großen Gehalt an mRNA, gewonnen und ihre mRNA nach Standardmethoden [z. B. Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, USA] isoliert. Ebenfalls nach Standardmethoden wird aus dieser mRNA nach Überführen in cDNA eine cDNA-Bank angelegt und mit einem Antiserum "gescreent", das durch Immunisierung geeigneter Tiere, z. B. Kaninchen, gewonnen wurde. Für die Immunisierung können Mikrosporidien aus der gleichen Kultur verwendet werden wie für die Gewinnung der mRNA. Die immunogenen Klone werden aus der cDNA-Bank nach Standardmethoden isoliert und in einen prokaryotischen oder eukaryotischen Vektor umklont und exprimiert [z. B. J. Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, USA].

Die einzelnen, rekombinanten Antigene werden anschließend in Immunoassays, beispielsweise nach Beschichtung einer Titerplatte in einem ELISA-Assay, zum Nachweis von Antikörpern gegen Mikrosporidien und damit zum Nachweis einer Mikrosporidieninfektion eingesetzt. Es ist mit Antigenen unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität zu rechnen: Für einen möglichst sensitiven Suchtest werden diejenigen Antigene ausgewählt, die mit Antisera gegen eine möglichst große Zahl verschiedener Mikrosporidienarten reagieren. Für die möglichst spezifischen Bestätigungstests werden diejenigen Antigene ausgewählt, die möglichst ausschließlich mit der zu ihrer Herstellung verwendeten Mikrosporidienart reagieren.

Eine weitere Ausgestaltung der Erfindung ist die Verwendung dieser sensitiven, bzw. spezifischen Antigene zur Immunisierung von Tieren, z. B. von Kaninchen und/oder Mäusen, und der dadurch möglichen Erzeugung polyklonaler und/oder monoklonaler Antikörper gegen diese Antigene. Diese werden nach Beschichtung einer Titerplatte in einem Antigen-"Capture"-Assay, z. B. einem Koproantigen-ELISA, zum Nachweis von Antigenen von Mikrosporidien aus klinischem Material und Umweltproben verwendet. Es ist mit Antikörpern unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität zu rechnen: Für einen möglichst sensitiven Suchtest werden diejenigen Antikörper ausgewählt, die mit Antigenen einer möglichst großen Zahl verschiedener Mikrosporidienarten reagieren. Für die möglichst spezifischen Bestätigungstests werden diejenigen Antikörper ausgewählt, die möglichst ausschließlich mit der zu ihrer Herstellung verwendeten Mikrosporidienart reagieren.

Eine weitere Ausgestaltung der Erfindung ist die Erzeugung rekombinanter Antigene weiterer, auch nicht-kultivierbarer Mikrosporidienarten, ohne daß diese zur Antigengewinnung kultiviert oder angereichert werden müssen. Vielmehr werden zu den flankierenden Bereichen der DNA, die für ein bereits charakterisiertes Antigen einer anderen Mikrosporidienart, z. B. *E. cuniculi*, kodiert, PCR-Primer synthetisiert und damit in einer PCR-Amplifikation der homologe Genabschnitt der anderen, u. U. nicht kultivierbaren Mikrosporidienart, z. B. *E. bienewisi*, isoliert. Dazu wird genomische DNA dieser Spezies verwendet, die aus klinischem Material, z. B. aus dem Stuhl eines infizierten Patienten, ohne vorherige Anreicherung oder Kultivierung gewonnen werden kann [z. B. gem. Katzwinkel-Wladarsch et al. (1996) Trop. Med. Int. Health 1:373-378]. Alternativ kann die homologe DNA-Sequenz der zweiten Mikrosporidienart auch durch Hybridisierung einer genomischen DNA oder einer cDNA mit dem Genabschnitt der ersten Mikrosporidienart identifiziert und isoliert werden, wozu aber eine größere Menge an genomischer DNA oder mRNA notwendig ist und deshalb von einer Anreicherung oder einer Kultivierung der Mikrosporidien abhängig ist.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Mikrosporidien und Mikrosporidieninfektionen, dadurch gekennzeichnet, daß gentechnisch/rekombinant hergestellte Mikrosporidienantigene verwendet werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß cDNA aus einer cDNA-Bank von einer Mikrosporidienkultur eingesetzt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine Kultur einer vermehrungsfähigen Mikrosporidienart angelegt wird, aus der Kultur mRNA isoliert wird, diese in cDNA überführt und damit die cDNA-Bank angelegt wird und anschließend die immunogensten Klone ausgewählt und isoliert werden und diese cDNA zu Expression von Antigenen verwendet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß entweder in einer Immunreaktion entstandene, gegen die Mikrosporidien gerichtete Antikörper mit den gentechnisch hergestellten Mikrosporidienantigenen nachgewiesen werden, oder daß die Mikrosporidien, oder Teile von ihnen, mit durch Immunisierung mit den gentechnisch hergestellten Mikrosporidienantigenen gewonnen Antikörpern direkt nachgewiesen werden.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die durch Immunisierung mit den gentechnisch hergestellten Mikrosporidienantigenen gewonnenen Antikörper polyklonale oder monoklonale Antikörper sind.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß entweder Antikörper, die für einen sensitiven Suchtest mit möglichst vielen Mikrosporidienspezies reagieren können oder Antikörper, die für einen spezifischen Test und/oder zur Artbestimmung mit möglichst wenigen Mikrosporidienspezies reagieren können, eingesetzt werden.
7. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß entweder Mikrosporidienantigene, die für einen sensitiven Suchtest zu einer Reaktion für möglichst viele Mikrosporidienspezies führen oder Mikrosporidienantigene, die für einen spezifischen Test und/oder zur Artbestimmung zu einer Reaktion für möglichst wenige Mikrosporidienspezies führen, eingesetzt werden.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß ausgehend von der cDNA, oder Teilen davon, Nukleinsäuresonden oder PCR-Primer für einen homologen Genabschnitt einer weiteren Mikrosporidienart gewonnen werden, mit diesen Nukleinsäuresonden eine Isolierung oder mit den PCR-Primern eine PCR-Amplifikation des homologen Genabschnittes der weiteren Mikrosporidienart durchgeführt und dieser Genabschnitt zur Expression des homologen Antigens der weiteren Mikrosporidienart verwendet wird.
9. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die cDNA, oder Teile davon, mit einer genomischen DNA oder einer cDNA einer weiteren Mikrosporidienart hybridisiert wird und damit die weitere Mikrosporidienart nachgewiesen wird.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der weiteren Mikrosporidienart um eine nicht oder nur schwierig kultivierbare Mikrosporidienart handelt.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß eine nicht oder nur schwierig kultivierbare Mikrosporidienart *Enterocytozoon bieneusi* ist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die mRNA zur Gewinnung der cDNA aus einer kultivierbaren Mikrosporidienart stammt.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß eine kultivierbare Mikrosporidienart *Encephalitozoon cuniculi* ist.
14. Verfahren zum Gewinnen von Mikrosporidienantigenen, mit den Schritten:
Gewinnen einer cDNA, die für ein Mikrosporidienantigen kodiert, aus der mRNA einer Mikrosporidienkultur;
Ausgehend von dieser cDNA Gewinnen von Nukleinsäuresonden oder PCR-Primern für homologe Genabschnitte einer weiteren Mikrosporidienart;
Damit Gewinnen des homologen Genabschnitts der weiteren Mikrosporidienart durch Hybridisierung mit der Nukleinsäuresonde oder in einer PCR-Amplifikation;
Gewinnen gentechnisch hergestellter Antigene der weiteren Mikrosporidienart durch Expression des homologen Genabschnitts.
15. Verfahren zum Gewinnen von Mikrosporidienantigenen, mit den Schritten:
Gewinnen einer cDNA, die für ein Mikrosporidienantigen kodiert, aus der mRNA einer Mikrosporidienkultur;
Hybridisieren der cDNA mit genomischer DNA oder einer cDNA-Bank einer weiteren Mikrosporidienart zum Gewinnen des homologen Genabschnitts der weiteren Mikrosporidienart;
Gewinnen gentechnisch hergestellter Antigene der weiteren Mikrosporidienart durch Expression des homologen Genabschnitts der weiteren Mikrosporidienart.
16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die weitere Mikrosporidienart eine nicht, oder nur schwierig, kultivierbare Mikrosporidienart ist.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die weitere Mikrosporidienart *Enterocytozoon bieneusi* ist.
18. Reagenziensatz zum Nachweis von Mikrosporidien und Mikrosporidieninfektionen, mit:
gentechnisch hergestellten Mikrosporidienantigenen, die über eine cDNA-Bank aus einer Mikrosporidienkultur gewonnen werden, oder
Antikörpern, die durch Immunisierung mit diesen gentechnisch hergestellten Mikrosporidienantigenen gewonnen werden.
19. Reagenziensatz zum Nachweis von Mikrosporidien und Mikrosporidieninfektionen, mit:
gentechnisch hergestellten Mikrosporidienantigenen, die nach dem Verfahren gemäß einem

der Ansprüche 14 bis 17 gewonnen werden, oder Antikörpern, die durch Immunisierung mit diesen gentechnisch hergestellten Mikrosporidienantigenen gewonnen werden.

20. Reagenziensatz nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß weitere Komponenten zur Durchführung eines ELISA vorhanden sind.

21. Verwendung von gentechnisch hergestellten Mikrosporidienantigenen zum Nachweis von Mikrosporidien und Mikrosporidieninfektionen, wobei die Mikrosporidienantigene durch Expression von Genen, oder Teilen davon, aus einer cDNA-Bank von einer Mikrosporidienkultur oder gemäß den Ansprüchen 14 bis 17 gewonnen werden.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	L.M. WEISS ET AL.: "Diagnosis of Encephalitozoon cuniculi infection by western blot and the use of cross-reactive antigens for the possible detection of microsporidiosis in humans" AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, vol. 47, no. 4, 1992, WASHINGTON DC USA, pages 456-462, XP002044633 see the whole document --- -/--	1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 October 1997

Date of mailing of the international search report

05. 11. 97

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van Bohemen, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 97/01453

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	L.M. WEISS ET AL.: "Utility of microsporidian rRNA in diagnosis and phylogeny: a review." FOLIA PARASITOLOGICA, vol. 41, - 1994 PRAGUE CZECH REPUBLIC, pages 81-90, XP002044634 cited in the application see the whole document ---	1-21
A	S. KATZWINKEL-WLADARSCH ET AL.: "Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens." TROPICAL MEDICINE AND INTERNATIONAL HEALTH, vol. 1, no. 3, 1 June 1996, OXFORD UK, pages 373-378, XP002044635 see the whole document -----	1-21

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01N33/569

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	L.M. WEISS ET AL.: "Diagnosis of Encephalitozoon cuniculi infection by western blot and the use of cross-reactive antigens for the possible detection of microsporidiosis in humans" AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, Bd. 47, Nr. 4, 1992, WASHINGTON DC USA, Seiten 456-462, XP002044633 siehe das ganze Dokument --- -/-	1-21



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

29. Oktober 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

05. 11. 97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Van Bohemen, C

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	L.M. WEISS ET AL.: "Utility of microsporidian rRNA in diagnosis and phylogeny: a review." FOLIA PARASITOLOGICA, Bd. 41, - 1994 PRAGUE CZECH REPUBLIC, Seiten 81-90, XP002044634 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-21
A	S. KATZWINKEL-WLADARSCH ET AL.: "Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens." TROPICAL MEDICINE AND INTERNATIONAL HEALTH, Bd. 1, Nr. 3, 1.Juni 1996, OXFORD UK, Seiten 373-378, XP002044635 siehe das ganze Dokument -----	1-21